

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE SELÊNIO E VITAMINA
E: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO DE
JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Rodrigo Yukihiro Gimbo
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE SELÊNIO E VITAMINA
E: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO DE
JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Rodrigo Yukihiro Gimbo

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Produção Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

Agradecimentos

Aos meus pais Francisco e Nelza por todos os ensinamentos, educação e disciplina que recebi. Um simples obrigado não bastaria para demonstrar minha gratidão por vocês.

A Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela atenção, orientação, carinho e respeito oferecidos durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi da Faculdade de Zootecnia da Unesp de Dracena, pela ajuda durante toda a fase de desenvolvimento e execução do projeto.

A Profa. Dra. Fabiana Pilarski do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, por todo o apoio fornecido durante.

Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, pela correção nas fases de elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp - Jaboticabal, por revisar a formulação das dietas e empréstimo do laboratório para análises e desenvolvimento do projeto.

Ao Flavio Daolio Gonçalves da FRI RIBE por fornecer o premix.

A minha namorada e melhor amiga Tomomi, pelo carinho, incentivo e por estar sempre por perto mesmo nos piores momentos.

A Damares pela amizade e colaboração durante esses dois anos.

A Paulinha foi de grande ajuda durante todas as fases do experimento. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos de laboratório Spinha, Jaque, Rullian, Rosangela, Luis, Marcos, Rafael e Mari pela amizade e ajuda durante o experimento.

Aos que já foram: Marcio, Sumo, Monica, Carla e Aline, levarei comigo a amizade de todos vocês.

Ao Rodrigo Vaz da empresa MCassab por fornecer a vitamina E e a Aline Vaz por transportar até Jaboticabal.

As amigas do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos: Gisele, Hellen e Lidiane, obrigado pela amizade de todas vocês.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos: Nycolas, Roberson, Santiago, Fernanda e Eduardo, agradeço pela bactéria e pela ajuda durante a coleta.

A Aninha e Michele, moradoras temporárias da Casa da Avó, mas que fizeram história na casa.

Aos amigos do Laboratório de Larvicultura de Peixes: Natalia, Taxinha, Rodrigo e Thiago, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos: Josimari, Rafael Ono e Juan, pela ajuda na montagem do experimento.

Ao Valdecir, Seu Mauro e demais funcionários e amigos do Centro de Aquicultura da UNESP.

Sou grato a todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta durante o período de realização do mestrado.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rodrigo Yukihiro Gimbo – nascido na cidade de Taubaté-SP, no dia 29 de julho de 1985, ingressou no curso de zootecnia pela Faculdade de Zootecnia – UNESP de Dracena, no ano de 2004. Durante a graduação participou de congressos, estágios e realizou experimento de iniciação científica, sob a orientação do Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi intitulado “Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)”, realizado no campus da UNESP de Dracena, onde obteve o grau de Zootecnista em fevereiro de 2009. No mesmo ano, ingressou no curso Mestrado pelo Programa de Pós graduação em Zootecnia (Produção Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati.

Índice

Resumo	1
Abstract.....	2
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
Introdução.....	3
Revisão Bibliográfica	5
A importância dos imunostimulantes na aquicultura.....	5
Utilização do selênio como imunostimulante	6
Uso da vitamina E como imunostimulante.....	8
Sistema imune de peixes.....	10
Uso da <i>Aeromonas hydrophila</i> em desafios	14
Objetivos Gerais	16
Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO 2 – VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DE JUVENIS DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SELÊNIO E VITAMINA E.	29
Resumo	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	39
Conclusões.....	53
Referências Bibliográficas	54
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

Índice de Figuras e Tabelas

Tabela 1. Cálculo para o ajuste de selênio e vitamina E.....	34
Tabela 2. Formulação e composição das dietas experimentais.....	35
Tabela 3. Análise de variância das variáveis de desempenho produtivo GP, TCE e K de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	40
Figura 1. Médias \pm desvio padrão do ganho de peso (g) de pacu alimentados com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferença entre os níveis ($P < 0,05$).....	41
Figura 2. Médias \pm desvio padrão de taxa de crescimento específico (g) de pacu alimentado com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferença entre os níveis ($P < 0,05$).....	42
Tabela 4. Comparação das médias da taxa de crescimento específico (%) (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	42
Tabela 5. Análise de variância das variáveis fisiológicas e imunológicas de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	43
Tabela 6. Comparação das médias da atividade respiratória de leucócitos (Burst) e leucócitos totais de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	44
Tabela 7. Comparação das médias de proteínas totais (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	46
Figura 3. Média e desvio padrão de proteínas totais, albumina e globulina antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).....	46
Figura 4. Médias e desvio padrão de glicemia de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....	47
Tabela 8. Análise de variância das variáveis de hematológicas de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....	47

- Figura 5.** Médias e desvio padrão de eritrócitos totais de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....49
- Tabela 9.** Comparação das médias de eritrócitos totais (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....49
- Figura 6.** Médias e desvio padrão de hematócrito. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....50
- Figura 7.** Médias e desvio padrão de volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....51
- Figura 8.** Médias e desvio padrão de hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....52
- Tabela 10.** Comparação das médias de concentração de hemoglobina (desdobramento da interação vitamina E x tempo) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.....52
- Figura 9.** Médias e desvio padrão de número de trombócitos de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E, antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).....53

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE SELÊNIO E VITAMINA E: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO DE JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Resumo – Já é de conhecimento que tanto o selênio quanto a vitamina E possuem capacidades imunoestimulante, separadamente. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação desses dois ingredientes em respostas biológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas, imunológicas e zootécnicas desta espécie à administração oral de três níveis de selênio (0; 0,6 e 1,2 mg.kg⁻¹), três níveis de vitamina E (0; 200 e 400 mg.kg⁻¹) e o perfil destas respostas antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*). O estudo formou assim, um fatorial 3x3x2, distribuído em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Em cada amostragem foram coletados, aleatoriamente, dois peixes de cada aquário para a biometria, coleta de sangue via punção da veia caudal e injeção intraperitoneal de *Aeromonas* nos peixes restantes. Com os dados da biometria, foram avaliados o ganho de peso, taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição. No sangue, foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos, trombócitos e leucócitos, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina, atividade respiratória de leucócitos, glicemia, proteínas totais, albumina e também foi estimado o valor de globulinas. O nível de 0,6 mg.kg⁻¹ de selênio promoveu o melhor ganho de peso e TCE. A atividade respiratória de leucócitos, número de leucócitos e trombócitos reduziram após o desafio. A inclusão de 1,2 mg.kg⁻¹ de selênio está relacionada com o aumento de proteínas totais e globulinas, independente da concentração de vitamina E, enquanto a deficiência de selênio resultou no aumento da glicemia. O número de eritrócitos sofreu influência tanto dos níveis de selênio como dos níveis de vitaminas E, as demais variáveis hematológicas foram observadas apenas efeito do selênio. A inclusão de 1,2 mg.kg⁻¹ de selênio e 200 mg.kg⁻¹ de vitamina E na dieta de juvenis de pacu mostrou-se satisfatória para o crescimento e imunidade dos peixes.

DIETARY OF SELENIUM AND VITAMIN E SUPPLEMENTATION IN PHYSIOLOGIC VARIABLES AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN PACU (*Piaractus mesopotamicus*) JUVENILE

Abstract – The immunostimulant capacity of selenium and of vitamin E is known. However, little is known about the interaction of these two ingredients on biological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenile. Thus, the purpose of this study was to evaluate the physiological, immunological and productive performance of this fish to the oral administration of three levels of selenium (0, 0.6 and 1.2 mg.kg⁻¹), three levels of vitamin E (0, 200 and 400 mg.kg⁻¹) and the profile of these responses before and after challenge with *Aeromonas hydrophila*. The study formed then a 3x3x2 factorial design, distributed in a randomized design with four replications. In each sample were collected randomly, two fish from each aquarium for biometrics, blood was collected via caudal vein puncture and intraperitoneal injection of *Aeromonas* in fish remaining. With biometric data, we assessed weight gain, specific growth rate (SGR) and condition factor. Blood was used to determine hematocrit, erythrocytes, thrombocytes and leukocytes count, mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin concentration, respiratory activity of leukocytes, blood glucose, total protein, albumin, and globulins concentration was estimated. The level of 0.6 mg.kg⁻¹ of selenium had the best average for weight gain and TBI. Respiratory activity of leukocytes, leukocytes and thrombocytes count decreased after challenge. The inclusion of 1.2 mg.kg⁻¹ of selenium are related to the total protein and globulin increase, independent of the concentration of vitamin E, while selenium deficiency resulted in increased blood glucose. The number of erythrocytes was influenced both the levels of selenium and vitamin E levels, the other hematological variables were observed only effect of selenium. The inclusion of 1.2 mg.kg⁻¹ of selenium and 200 mg.kg⁻¹ of vitamin E in the diet of juvenile pacu was satisfactory for growth and immunity of fish

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

Ao longo dos anos, a produção de peixes vem se consolidando e ocupando maior espaço no mercado. Paralelamente a este aumento, a intensificação dos sistemas de produção demonstra que a produção fundamentada exclusivamente no rápido crescimento do animal não é suficiente para manter a atual produtividade sem afetar o meio e a resistência orgânica dos peixes, gerando impactos ambientais e econômicos em toda a cadeia produtiva (FALCON, 2007).

Vários são os aspectos a serem avaliados em uma ração. Sua composição e sua atuação no metabolismo de determinados ingredientes podem determinar a condição do peixe para transpor situações adversas. BLAZER (1992) destacou que nem sempre a ração que promove o rápido crescimento dos peixes, determina a melhor resistência às doenças.

Os peixes nem sempre adoecem e morrem quando são desafiados por agentes estressores. Normalmente, adaptam-se ao estresse por um período de tempo finito (BARTON e IWAMA, 1991). Durante este período, os peixes podem parecer normais, embora estejam utilizando reservas energéticas e redirecionando o uso da energia em função das exigências extras impostas. Nesta condição, deixam de crescer e de se reproduzir, priorizando o retorno à condição de homeostase. Se há necessidade de redistribuição de energia, os peixes devem estar preparados, principalmente, para prover energia, além de outros compostos como vitaminas e minerais que agirão como substrato para o funcionamento adequado do sistema imunológico.

De acordo com LIM et al. (2008), a necessidade de vitaminas para o crescimento, funções bioquímicas e fisiológicas já é determinado para diversas espécies comerciais utilizadas na aquicultura. A maioria dos trabalhos avaliando a participação das vitaminas e com funções benéficas sobre as atividades imunes dos peixes, envolvem a vitamina C e E, entretanto, pouco se sabe a respeito da interação de vitaminas e minerais. MORAES et al. (2003) demonstraram que

algumas vitaminas exercem efeitos imunoestimulantes em peixes. A vitamina E ou tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que protege as lipoproteínas das membranas biológicas contra a oxidação (MONTERO et al., 1999; HUNG et al., 2007; MARTINS et al., 2008) e aumenta a absorção de vitamina A (CONN e STUMPF, 1984), melhorando sua resposta a estímulos agressores.

Com exceção do ferro (Fe), pouco se sabe a respeito da participação de outros microminerais na imunidade dos peixes e na resistência à doenças. Muitos microminerais possuem funções biológicas que afetam o sistema imune e os mecanismos de defesa dos peixes (LIM et al., 2008).

O selênio (Se) apresenta um papel ativo no sistema imunológico e reduz o risco de infecções por vírus. A proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos são estimuladas pelo Se (HUGHES, 2000). É também importante para o crescimento e para assegurar um metabolismo adequado. Além disso, melhora a contagem de espermatozoides e apresenta efeito cardioprotetor (REILLY, 1998).

WALSH et al. (1993) sugerem que a deficiência de selênio associada a deficiência de vitamina E é devido ao efeito antioxidante de ambos. O selênio é parte integrante da enzima glutathione peroxidase, uma importante proteção celular contra os danos causados pela oxidação dos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) (ROTRUCK et al., 1973; NRC, 1993, LEUNG, 1998). Segundo WATANABE et al. (1997), o nível de atividade da glutathione peroxidase, no fígado ou no plasma, pode ser indicativo do fornecimento de Se ao organismo.

Apesar do selênio e da vitamina E possuírem funções bioquímicas diferentes, estes micronutrientes possuem atividades complementares (COMBS e SCOTT, 1974). Estudos indicam que o selênio e a vitamina E são capazes de manter as funções normais das respostas imunes. A deficiência de selênio nos animais diminui as respostas dos anticorpos, especialmente se associado com a deficiência de vitamina E. Segundo DHUR et al. (1990), animais suplementados com selênio respondem positivamente contra infecções bacterianas. Em bagre do canal, a produção do ânion superóxido é maior em dietas com suplementação de Se e vitamina E, quando comparados com dietas cuja suplementação é de apenas

um dos nutrientes (WISE et al., 1993). Por outro lado, existem resultados que indicam que o Se e a vitamina E não possuem efeito sinérgico à resistência a doenças em tilápia do nilo (KIM et al., 2003).

Segundo BLAZER (1992), o potencial para o aumento da resistência a doenças nos peixes criados com ração, certamente, existe. Entretanto, o mecanismo individual de resistência e efeitos de vários nutrientes e da inter-relação desses com os demais presentes na dieta necessitam ser melhores estudados para se definir a ração que possa contribuir de maneira positiva no aumento da resistência dos peixes (BARROS et al., 2006).

O pacu é dos peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. É um peixe onívoro, que se alimenta de folhas, caule, frutos e sementes, e oportunamente, alimenta-se de insetos, aracnídeos, moluscos e outros peixes (URBINATI et al., 2010). Este peixe adapta-se facilmente a dietas comerciais. Segundo JOMORI et al. (2000) a substituição do alimento vivo por dieta seca, mostrou-se viável após nove dias da primeira alimentação. Entretanto o ciclo de produção pode levar de 10 meses (LENHONARDT e DÓRIA, 1992) a 13 meses (SCORVO-FILHO et al., 1998). E dentre os peixes de cultivo no estado de São Paulo, o pacu é a espécie mais acometida com infestações parasitárias (MARTINS et al., 2002). Neste cenário, estudos que maximizem o crescimento e as respostas imunológicas dos peixes, reduzindo a utilização de quimioterápicos, são de extrema importância para garantir ao consumidor um produto final de qualidade

Revisão Bibliográfica

A importância dos imunostimulantes na aqüicultura

Nos últimos anos, aumentou o interesse científico na investigação e identificação de compostos com atividade biológica oriundos de diferentes organismos, que possuem aplicabilidade em vários ramos da ciência. Dentre

esses compostos, os imunostimulantes podem ser citados. Essas substâncias têm sido cada vez mais utilizadas na aquicultura, devido à grande variedade de parasitas, fungos, bactérias e vírus que afetam a produção dos organismos aquáticos, causando grandes perdas econômicas (TINMAN et al., 2000).

Os imunostimulantes previnem doenças em peixes, crustáceos e outros animais, podendo ser muito úteis na aquicultura. Em revisão sobre o assunto, SAKAI (1999) relatou diversos trabalhos sobre o uso de imunostimulantes em peixes e crustáceos. Esses compostos ativam, principalmente, a função fagocítica das células de defesa e elevam suas atividades bacteriostáticas. A ativação das funções imunológicas está associada com o aumento da proteção contra doenças infecciosas a diversos patógenos.

Em função do alto risco de resistência de determinadas cepas de bactérias patogênicas, ocasionada pelo manejo incorreto de dosagens subterapêuticas de antibióticos e quimioterápicos, existe uma tendência mundial para limitação e proibição da utilização de grande parte destes compostos na produção animal. Tal questão deve ser amplamente discutida, já que pode representar uma ameaça para o surgimento de enfermidades de difícil controle, que afetariam a produção e, principalmente, comprometeriam a saúde pública e o meio ambiente (PARK e JEONG, 1996; HISANO et al., 2008).

Utilização do selênio como imunostimulante

O selênio (Se), elemento não-metálico entre o enxofre (S) e o telúrio (Te) no Grupo VI da tabela periódica, é um micronutriente essencial na nutrição humana e animal, incluindo os peixes (WATANABE et al., 1997). De acordo com a concentração, pode apresentar três diferentes atividades biológicas: 1) concentrações-traço: exigidas para o crescimento e desenvolvimento normais; 2) concentrações moderadas: estocadas para manutenção das funções homeostáticas; 3) concentrações elevadas: apresenta efeitos tóxicos (HAMILTON,

2004). Dessa forma, o Se pode ser tanto um elemento essencial quanto tóxico. Para o Se, a diferença entre toxicidade e essencialidade ocorre em um intervalo estreito de concentração, e é função de sua concentração, solubilidade, absorção, biodisponibilidade, espécies envolvidas e da via de entrada no organismo (SCHWARZ e PATHAK, 1975; DÍAZ et al., 1996).

O selênio é essencial para o funcionamento eficiente do sistema imune, tanto nos animais, como em humanos. A imunidade e o sistema imune consistem numa série de processos que atuam juntos para proteger o organismo contra patógenos (KRYUKOV e GLADYSHEV, 2002; LESCURE et al., 2002).

Os peixes podem absorver o Se, assim como outros microminerais essenciais, diretamente da água pelas brânquias, do trato digestório e do tegumento (WATANABE et al., 1997; HAMILTON, 2004). A incorporação do Se na forma de selenito, pelas brânquias, é freqüente, mesmo quando este está presente em baixas concentrações na água, interferindo assim na determinação das exigências nutricionais deste mineral (NRC, 1993). Entretanto, pelo fato dos peixes ocuparem níveis tróficos elevados na cadeia alimentar aquática, a dieta é a forma predominante de absorção de Se (DALLINGER et al., 1987).

Segundo STEFFENS (1989), o nível mínimo de Se requerido em dieta de peixes encontra-se entre 0,2 e 0,5 mg.kg⁻¹. Em juvenis do salmão do Atlântico, a deficiência de Se resultou em crescimento reduzido, baixa atividade da glutathione peroxidase, anemia, despigmentação cutânea, lesões no pâncreas e fígado e elevada mortalidade (POSTON et al., 1976).

Mais recentemente, LIN e SHIAU (2005), determinando a exigência dietética de Se em juvenis de *Epinephelus malabaricus*, encontraram como níveis ideais 0,7 – 0,8 mg de Se.kg⁻¹ dieta. WANG et al. (2007) observaram em juvenis da carpa *Carassius auratus gibelio* que a suplementação de Se na dieta é necessária, uma vez que os peixes alimentados com a dieta basal (sem suplementação) apresentaram reduzido crescimento.

Uso da vitamina E como imunestimulante

A exigência vitamínica dos peixes não é conhecida com precisão e os níveis recomendados são médios. Quando a ingestão é inferior ao recomendado, durante muito tempo, pode induzir a um estado de subnutrição, enquanto níveis superiores ao aporte recomendado apresentam o risco de aparecimento de estado tóxico. Em relação ao consumo excessivo, existem poucas informações quanto às doses responsáveis por esses efeitos (SAMPAIO, 2003).

A vitamina E é uma descrição genérica muito utilizada para lipídeos intimamente relacionados, os tocoferóis e tocotrienóis. Na natureza são encontradas oito formas de vitamina E, denominados α , β , Δ e g tocoferóis e tocotrienóis, que diferem entre si na localização do grupo metil do anel aromático de sua cadeia molecular (DEVLIN, 1997). Foi descoberta em 1922, e descrita como fator nutricional considerado especialmente importante na reprodução animal. Sua substância mais ativa, chamada de tocoferol, foi isolada em 1936 por Evans (QUINN, 1999). Aparentemente, o α -tocoferol é o tocoferol predominante em biomembranas e é mais efetivo na doação de elétrons devido à posição orto do seu grupo metil, quando comparado aos seus isômeros (PARKER, 1989). Está presente nas plantas e sementes, sendo encontrado em concentrações significantes nos óleos vegetais, gérmen ou farelo de glúten, leveduras, gema de ovo e fígado (ANDRIGUETTO, 1999).

A vitamina E constitui a primeira linha de defesa dos sistemas biológicos. Atua principalmente protegendo as membranas dos compostos oxidáveis do citoplasma celular, fazendo a estabilização dos ácidos graxos insaturados e quebrando as cadeias de peróxidos (YAMAMOTO et al., 2001). Ela previne a formação de hidroperóxidos lipídicos em seu estágio inicial pela doação de um átomo de hidrogênio a essa espécie reativa (FANG et al., 2002), resultando em um radical α -tocoferoxil. Esse radical é reduzido novamente à α -tocoferol (TOH) com a doação de elétrons pelo ácido ascórbico (AZZI & STOCKER, 2000). Esta importante função da vitamina E de resistência à oxidação, especialmente em

leucócitos, está ligada à liberação de radicais que participam da atividade microbicida dos macrófagos. Em peixes, a vitamina E também é considerada muito importante por sua ação imune não específica. Ela também previne a imunossupressão na resposta de estresse promovido pela alta densidade de estocagem (MONTERO et al., 1999; BELO et al., 2005). Dietas suplementadas com 450 mg de vitamina E foram capazes de reduzir os níveis plasmáticos de cortisol em pacu, favorecendo o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo (BELO et al., 2005). Tilápias alimentadas com dieta suplementada com 500 mg kg⁻¹ das vitaminas C e E, quando injetadas intraperitonealmente com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, apresentaram redução no número total de neutrófilos circulantes no sangue, possibilitando uma maior migração de células de defesa, leucócitos e trombócitos para a bexiga natatória (MARTINS et al., 2008).

A hipovitaminose E acarreta distrofia muscular em cobaias e coelhos, e, em frangos, ocorrem anormalidades vasculares (CONN e STUMPF, 1984). Peixes tratados com dietas deficientes em vitamina E apresentaram perda de apetite, diminuição da conversão alimentar, diminuição do hematócrito, sinais de distrofia muscular e encurtamento do opérculo (BAI e LEE, 1998). A deficiência de vitamina E promoveu sinais clínicos distintos em *Notemigonus crysoleucas* alimentados durante 10 semanas com dieta desprovida da vitamina. Dentre os sinais estavam o escurecimento da superfície corporal, resposta lenta à alimentação, natação errática, caquexia associada com a perda do músculo epaxial e hemorragia. Cortes histológicos da musculatura revelaram que algumas fibras estavam severamente atrofiadas, necrosadas e com infiltrados inflamatórios de leucócitos nos tecidos conectivos (CHEN et al., 2004). Essa deficiência também induz a fragilidade de eritrócitos causando sua degeneração em espécies como o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (WILSON et al., 1984; WISE et al., 1993), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (HANRE et al., 1997) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (FURONES et al., 1992).

A administração profilática de imuno-estimulantes pode prevenir as infecções aumentando a eficiência das barreiras de defesa dos peixes (REQUE, 2005, SAKABE, 2007).

Considerando os resultados obtidos por GARCIA et al (2007), que trabalharam com juvenis de pacu, a suplementação ideal de vitamina E para a espécie é de 250 mg kg⁻¹, quando associada à suplementação de 500 mg kg⁻¹ de vitamina C (concentração comumente utilizada em rações comerciais).

Sistema imune de peixes

O sistema imune de peixes, assim como dos mamíferos, é dividido em inato ou não específico e específico. A resposta inata ou não específica, que consiste na primeira barreira de defesa do organismo para impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao hospedeiro, bloqueando sua entrada e eliminando os patógenos e, a resposta imune específica, caracterizada pela especificidade e memória imunológica, induzida por substâncias denominadas antígenos (IWAMA e NAKANISHI, 1996; BERNSTEIN et al., 1998).

O sistema inato ou não específico pode se apresentar de duas formas: imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade humoral é aquela mediada por substâncias não específicas encontradas em fluidos corpóreos, como muco, soro e ovos de peixes, com a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Essas substâncias são proteínas e glicoproteínas, entre elas a lisozima e sistema complemento (SHOEMAKER et al., 2001).

A lisozima é uma enzima lítica de origem leucocitária de grande importância para o sistema de defesa inespecífico, por possuir capacidade de promover proteção contra invasões de microrganismos. Pode ser encontrada principalmente em locais onde há maior probabilidade de ocorrer invasão bacteriana e em tecidos que possuam grande quantidade de leucócitos, tais como muco, sangue, tecido linfóide, ovos e outros fluidos corpóreos de peixes de água doce e marinha

(OOHARA et al., 1991; YOUSIF et al., 1991; SHAILESH SAURABH e SAHOO, 2008). Em peixes, esta enzima se encontra em maior quantidade em neutrófilos, monócitos e macrófagos, assim o rim cefálico é o órgão onde há maior concentração desta proteína, seguido pelo trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (MURRAY e FLETCHER, 1976; LIE et al., 1989).

Entretanto, a atividade dessa enzima sofre influência de fatores como estação do ano, sexo, estágio de maturação sexual, temperatura da água, estresse e poluição (FLETCHER et al., 1977; STUDNICKA et al., 1986; MOCK e PETERS, 1990). A atividade da lisozima pode ser influenciada também pela condição de estresse a qual os peixes são submetidos. MOCK e PETERS (1990) observaram em trutas arco-íris redução da concentração da lisozima após transporte e exposição à poluentes. Resultados semelhantes foram encontrados por CARUSO e LAZARD (1999) em tilápias estocadas sob altas densidades.

O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma, que atuam nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (SECOMBES, 1996), além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório (ROED et al., 1992). Estas proteínas normalmente se encontram na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, em efeito cascata, graças a um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado (RUS et al., 2005).

A ativação do sistema complemento ocorre pelas vias clássica e alternativa. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e agregados de imunoglobulinas, enquanto a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, mas de presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma. Em peixes, a atividade bactericida é decorrente principalmente da ativação da via alternativa (KOPPENHEFFER, 1987).

A imunidade celular é mediada por diversas células de defesa como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas, que vão atuar na lise e eliminação de patógenos intracelulares nos peixes (SECOMBES, 1996).

Os trombócitos são células sanguíneas completas encontradas em aves, répteis, anfíbios e peixes (TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS et al., 2000; MARTINS, 2000; MARTINS et al., 2001), com função de hemostasia e homeostasia (ROBERTS, 1981; PENHA, 1996; BELETTI et al., 1998). São consideradas células de defesa, pela capacidade fagocítica, e por possuir substâncias como a fosfatase ácida, além de estarem presentes em exsudatos inflamatórios (PENHA et al., 1996; TAVARES-DIAS et al., 1999).

Os monócitos possuem atividade fagocitária e citotóxica não-específica, sendo considerados células em trânsito no sangue e, durante o processo inflamatório, migram para tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (ALAYE-RAHY, 1993; MESEGUER et al., 1994; WITTEN et al., 1998; CUESTA et al., 1999).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares que podem ser encontradas no sangue, tecidos linfóides e na cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996). Possuem a capacidade de fagocitar e produzir ânions superóxidos que atuam como bactericida extracelular (PLYZYCZ et al., 1989). Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente em 24 horas (SECOMBES, 1996).

Os eosinófilos atuam nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação, e se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastro-intestinal, nas brânquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos. Já os basófilos são raros na maioria dos peixes (HINE, 1992).

Os fagócitos supracitados (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e conseqüente extermínio do patógeno (VERLHAC e GABAUDAN, 1997). Durante

o processo da fagocitose ocorre aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como “burst” oxidativo, que decorre pela redução do oxigênio em ânion superóxido que, através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, se transformando em hipoclorito levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem ativamente para a destruição de microrganismos, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre suas membranas (VERLHAC et al., 1998).

A determinação das EROs produzidas pelos leucócitos pode ser detectada por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990).

Por outro lado, a resposta imune específica leva a formação de anticorpos e memória imunológica após o reconhecimento do agente invasor pelas células do sistema imune e também se apresenta dividida em resposta imune humoral e celular (SECOMBES, 1996).

Pela via humoral, após a invasão de microrganismos patogênicos, os linfócitos B de um órgão linfóide, que possuem na membrana receptores específicos para antígenos, dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória, que produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Essas células de memória estão aptas a responder prontamente a um próximo contato com o antígeno (SECOMBES, 1996).

A via celular é representada pelos linfócitos T (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T supressores e linfócitos T memória) que possuem a capacidade de reconhecer antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de macrófago e assim promover a sua proliferação (SECOMBES, 1996).

Os peixes são suscetíveis a doenças causadas por agentes como bactérias, fungos, vírus e parasitos. Porém, diversos fatores atuam para que o sistema imunológico seja ou não eficaz frente à enfermidade (BALFRY e HIGGS, 2001). Em diversas espécies de teleósteos, é comum ocorrer variabilidade individual nas respostas fisiológicas (DEMERS e BAYNE, 1997), principalmente devido à variação genética, alterações ambientais, condições de estresse, nutrição e patógeno ao qual o peixe é submetido (SHOEMAKER et al., 2001). Vale ressaltar que para promover proteção externa e interna contra agentes infecciosos, ocorre a interação de todos os mecanismos do sistema imune (FERNANDEZ et al., 2002).

Uso da *Aeromonas hydrophila* em desafios

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é um bastonete gram negativo, com mobilidade através de flagelos polares. Não produz esporos, é uma bactéria não capsulada e anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993). Tem ampla distribuição geográfica e causa a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN e AUSTIN, 1987). A doença causada pela *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (POST, 1987), acometendo peixes em condições de estresse e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis*. Alguns isolados podem ser considerados patógenos entéricos de humanos. Assim, a presença de elevados níveis de *Aeromonas* no ambiente de criação pode apresentar risco de infecção para o peixe e também para funcionários da piscicultura e consumidores (VIEIRA, 2003).

ANGKA et al. (1995) isolaram *A. hydrophila* de bagre do canal de diversos ambientes, no oeste de Java, na Indonésia, e verificaram que as cepas da bactéria

apresentaram diferentes níveis de virulência. Várias cepas foram capazes de provocar lise de eritrócitos de peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e do homem. Até cinco dias após a injeção intraperitoneal da bactéria, os peixes apresentaram lesões musculares, na pele do local da injeção, no fígado e rins. A presença deste patógeno é maior em águas com temperaturas mais elevadas, particularmente na aquicultura de países tropicais. A *A. hydrophila* é considerada grave problema econômico, porém é difícil distinguir as perdas diretas causadas por esta doença das de outras infecções concomitantes (VIEIRA, 2003).

O uso de antibióticos para tratar infecções bacterianas e sua incorporação em doses sub-terapêuticas na ração de peixes resultou em aumento global da resistência aos antibióticos pelas bactérias. Neste sentido, VIVEKANANDHAN et al. (2002) isolaram 319 cepas de *A. hydrophila* de 536 peixes e 278 camarões, durante dois anos. A resistência foi testada frente à 15 antibióticos e 100% das cepas apresentaram resistência à metilina e rifampicina, 99% à bacitracina e novobiocina e 3% ao clorafenicol.

Considerando esse problema, várias pesquisas relacionadas ao uso de imunostimulantes para a prevenção de doenças na aquicultura têm sido realizadas (SIWICKI et al., 1994; PARK e JEONG, 1996). SIWICKI et al. (1994) relataram o potencial uso de diversas substâncias imunostimulantes na criação de trutas arco-íris para a prevenção da doença causada pela *A. salmonicida*. Os peixes alimentados com dietas suplementadas com vitamina C se mostraram mais resistentes à doença. SOBHANA et al. (2002) verificaram que *Cirrhinus mrigala* alimentados com suplemento dietético contendo 1000 mg de vitamina C.kg⁻¹, e submetidos ao desafio com *A. hydrophila*, apresentaram menor taxa de mortalidade que o grupo que não recebeu o suplemento.

Objetivos Gerais

Baseado nos dados descritos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e imunológicas de juvenis de pacu alimentados com diferentes concentrações de selênio e vitamina E antes e após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Referências Bibliográficas

ALAYE-RAHY, N. Hematologia de atherinidos de águas dulces: gênero *Chirostoma* spp. Del lado de Patzcuaro, Mich. **Ciencia Pesquera**, v.10, p.97-109, 1993.

ANDRIGUETTO, J. M. **Nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 395 p, 1999.

ANGKA, S.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v.130, p.103-112, 1995.

AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. **Ellis Horwood Limited**, p.171-173 , 1987.

AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: nonantioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 231-255, 2000.

BAI, S.C.; LEE, K. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, v. 161, p. 405-414, 1998

- BALFRY, S. K., IWAMA, G. K. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry Physiology**. B, v. 138, p. 207-211, 2004.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.; FALCON, D.R.; GUIMARAES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, 2, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2006,
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Rev. Fish Diseases**, v.1, p.3-26, 1991.
- BELETTI, M.E.; SILVA, M.; SANTOS, A.L.Q.; MANNA, F.D.; SOARES, J.M. e FERREIRA, C.A.Q. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. **Bioscience Journal**, v.14, p.3-10, 1998.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.R.E. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154 2005.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. (Ed.) **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2ed. p.215-242. 1998.
- BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Rev. Fish. Diseases**, p.309-323, 1992.

CARUSO, D., LAZARD, J. Subordination stress in Nile tilapia and its effect on plasma lysozyme activity. **Journal of Fish Biology**. v. 55, n.2, p. 451–454, 1999

CHEN, R., LOCHMANN, R., GOODWIN, A., PRAVEEN, K., DABROWSKI, K., LEE, K. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, v. 242, p. 553–569, 2004.

COMBS, G. F., JR., SCOTT, M. L. Antioxidant effects on selenium and vitamin E function in the chickens. **Journal of Nutrition**. V.104, p.1297–1301, 1974.

CONN, E.E., STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. 4 ed. Sao Paulo: Edgard Blucher LTDA,. 531p, 1984

CUESTA, A., ORTUÑO, J., RODRIGUEZ, A., ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. **Fish Shellfish Immunol**, v. 13, p. 279- 291, 2002.

DALLINGER, R.; PROSI, F.; SEGNER, H.; BACK, H. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. **Oecologia**, v.73, p.91-98, 1987

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher. 1007 p, 1997.

DHUR, A.; GALAN, P.; HERCBERG, Relationship between selenium immunity and resistance against infections. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 271-280, 1990.

DÍAZ, J.P.; NAVARRO, M.; LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M.C. Selenium (IV) and (VI) levels in potable, irrigation and waste waters from an industrial zone in southeastern Spain. **The Science of the Total Environment**, v.186, p.231-236, 1996.

FALCON, D.R. **β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração.** Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 158p, 2004.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v.18, p. 872– 879, 2002.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTIC**, v.16, 2002.

FLETCHER, T.C.; WHITE, A.; BALDO, B.A. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lump sucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.57B, p.353-357, 1977.

FURONES, M.D., ALDERMAN, D.J., BUCKE, D., FLETCHER, T.C., KNOX, D. & WHITE, A. Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. **Journal of Fish Biology**. v. 41, p. 1037–1041, 1992.

GARCIA, F., PILARSKI, F., ONAKA, E.M., MORAES, F.R., MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. v. 271, p. 39-46, 2007

HAMILTON, S.J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Science of the Total Environment**, v.326, p.1-31, 2004.

HANRE, K. *et al.* Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon. **Free Radical Biology e Medicine**, New York, 22: 137-149, 1997.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.2, p.79-88. 1992.

HISANO, H., BARROS, M.M., PEZZATO, L.E. Parede celular de levedura em rações para alevinos de tilápia do Nilo. Boletim **de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agropecuária Oeste**, Dourados-MS 19p, 2008.

HUGHES, D. A. Dietary antioxidants and human immune function, **Nutrition Bulletin**, v. 25, p. 35-41, 2000.

HUNG, S., TU, C., WANG, W. In vitro effects of singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1-15, 2007.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The Fish Immune System. San Diego: **Academic Press**, 1996.

JOMORI, R.K., PORTELLA, M.C., CARNEIRO, D.J. Efeitos do nível de alimentação e do tempo de substituição do alimento vivo por dieta artificial no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Simposio Brasileiro de Aquicultura, 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CD-ROM, 2000.

KIM, K. W.; WANG, X.; CHOI, S. M.; PARK, G. J.; KOO, J. W.; BAI, S. C. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of

Edwardsiella tarda in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 12, p. 1055-1058, 2003.

KLEIN, J. Immunology. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc., p.311-334, 1990. KOPPENHEFFER, T.L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v.11, p.279-286, 1987.

KOPPENHEFFER, T. L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 11, p. 279-286, 1987.

KRYUKOV, G.V. GLADYSHEV, V.N. Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatic methods. In: Methods in Enzymology 347 (Sies, H. & Packer, L., eds.),. **Academic Press**, San Diego, CA, p. 84–100, 2002.

LENHONARDT, J.H., DORIA, C.R.C. Avaliação econômica de um sistema de policultivo semi-intensivo com ração e adubo orgânico. Simposio Brasileiro de Aquicultura, 1992, Peruibe, **Anais...** Peruibe, SP: ABRAq, 1992.

LESCURE, A., GAUTHERET, D.; KROL, A. Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. In: Methods in Enzymology 347 (Sies, H. & Packer, L., eds.), **Academic Press**, San Diego, CA. p. 57–70, 2002.

LEUNG, F.Y. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.9, p.304-307, 1998.

LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSDAL, E. Study of lysozyme activity in some fish species. **Diseas Aquatic Organism**, v. 6,p. 1-5, 1989.

LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. H. Nutrition and Diseases resistance in fish. In: CYRINO, J. E. P.; BUREAU, D.; KAPOOR, B. G. **Feeding and digestive functions in fishes**, Science Publishers, p. 478-545, 2008

LIN, Y.; SHIAU, S. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v.250, p.356–363, 2005.

MARTINS, M.L., et al. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.

MARTINS, M. L., MIYAZAKY, D. M. Y., MORAES, F. R., GHIRALDELI, L., ADAMANTE, W. B., MOURINO, J.L.P. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciencia Rural**, v. 38, p. 213-218, 2008.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A.M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). **The Anatomical Record**, v.239, p.468-474, 1994.

MOCK, A.; PETERS, G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. **Journal of Fish Biology**, v.37, p.873-885, 1990.

MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, v.171, p. 269-278, 1999.

MORAES, J.R.E., FREITAS, J. B., BOZZO, F.R., MORAES, F.R. E MARTINS, M. L. A Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 57-67, 2003.

MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology**, v.9, p.329-334, 1976.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of fish. Washington: **National Academy Press**, p.114, 1993.

OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, v.19, p.17-26, 1991.

PARK, H.H.; JEONG, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*O. niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharidae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 135-143, 1996.

PARKER, R. S. Dietary and biochemical aspects of vitamin E. **Advocate Food Nutrition and Research**, v. 33, p. 157232, 1989.

PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.33, p.15-18, 1996.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.217-224. 1989

POST, G. Fish health. **T. F. H. Publications**, p.37-41, 1987.

POSTON, H.A.; COMBS Jr, G.F.; LEIBOVITZ, L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Gross, histological and biochemical deficiency signs. **Journal of Nutrition**, v.106, p.892-904, 1976.

QUINN, P. J.; WANG, X. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 38, p. 309-336, 1999.

REILLY, C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. **Trends Food Science Technology**., v. 9, p. 114-118, 1998.

REQUE, V.R. 2005. **Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* inativada em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, 2005.

ROBERTS, R.J. **Patología de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p. ISBN 8471141043.

ROED, K.H.; FJALESTAD, K.; LARSEN, H.J.; MIDTHJEL, L. Genetic variation in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Fish Biology**, v.40, p.739-750, 1992.

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p.588-590, 1973.

RUS H, CUDRICI C, NICULESCU F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunology Research**; v.33, p.103-12, 2005.

SAKABE, R. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura da Unesp. Jaboticabal, SP, 78 p., 2007.

SAKAI, M. Current reserarch status of fish imunoestulants. **Aquaculture** v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999.

SHAILESH SAURABH E SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223-239, 2008.

SAMPAIO, F.G. **Selênio e vitamina E em dietas para a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP). Botucatu, 99 p., 2003.

SCHWARZ, K.; PATHAK, K.D. The biological essentiality of selenium and the development of biologically active organoselenium compounds of minimum toxicity. **Chemica Scripta**, v.8, p.85-95, 1975.

SCORVO-FILHO, J.D., MARTIM, N.B., AYROSA, L.M.S. Piscicultura em Sao Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de producao na safra de 1996/1997. **Informacoes Economicas**, v. 28, n. 41-60, 1998.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press. p.95-103, 1996

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. Nutrition and Fish Health. New York: **Food Products Press**, 2001. p.149-162.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and immunopathology**. v.41, p.123- 139, 1994.

SOBHANA, K.S. MOHAN, C.V, SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. v.207, p.225-238, 2002.

STEFFENS, W. **Principles of fish nutrition**. New York: Ellis Horwood, p.384, 1989. STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p.269-277, 1993.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993. p.269-277.

STUDNICKA, M.; SIWICKI, A.; RYKA, B. Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bamidgeh**, v.38, p.22-25, 1986.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R. E PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitaria. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v.21, p.337-342, 1999.

TINMAN, S.; KELVIN, F.; CARVALHO-FILHO, J. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and immunoestimulation response of hybrid tilapia (*O. aureus* X *O. niloticus*). **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, 5th. Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro. v. 2, p. 524-532, 2000.

URBINATI, E.C., GONCALVES, F.D., TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) In: BALSISSEOTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Segunda edição. Santa Maria: Editora UFSM, v. único, p. 205-244, 2010.

VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 380p, 2003.

VIVEKANANDHAN, G; SAVITHAMANI, K; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**. v.76, p.165-168, 2002.

WALSH, D. M., KENNEDY, D. G., GOODALL, E. A. & KENNEDY, S. Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both. **British Journal of Nutrition**. v. 70, p. 621–630, 1993.

WANG, Y.; HAN, J.; LI, W.; XU, Z. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Animal Feed Science and Technology**, v.134, p.243–251, 2007.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185-207, 1997.

WILSON, R. P., Bowserazand, P., Poe, W. E. 1984. Dietary Vitamin E Requirement of Fingerling Channel Catfish. **J. Nutr.** v. 114, p. 2053-2058, 1984.

WISE, D. J., TOMASSO, J. R., SCHEWEDLER, T. E., GATLIN, D. M., BAI, S. C., BLAZER, V. S. Effect of vitamin E on the immune response of channel catfish to *Edwarddissiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 5, p. 183-188, 1993.

WITTEN, P.E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v.76, p.310-319, 1998.

YAMAMOTO, Y. et al. An unusual vitamin E constituent provides enhanced antioxidant protection in marine organisms adapted to coldwater environments. **Proceedures of National Academic of Sciences**, v. 98, p. 13144-13148, 2001.

YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.10, p.45-49, 1991.

CAPÍTULO 2 – VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E DESEMPENHO PRODUTIVO DE JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SELÊNIO E VITAMINA E.

Resumo – Já é de conhecimento que tanto o selênio quanto a vitamina E possuem capacidades imunoestimulante, separadamente. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação desses dois ingredientes em respostas biológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas, imunológicas e zootécnicas desta espécie à administração oral de três níveis de selênio (0; 0,6 e 1,2 mg.kg⁻¹), três níveis de vitamina E (0; 200 e 400 mg.kg⁻¹) e o perfil destas respostas antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*). O estudo formou assim, um fatorial 3x3x2, distribuído em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Em cada amostragem foram coletados, aleatoriamente, dois peixes de cada aquário para a biometria, coleta de sangue via punção da veia caudal e injeção intraperitoneal de *Aeromonas* nos peixes restantes. Com os dados da biometria, foram avaliados o ganho de peso, taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição. No sangue, foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos, trombócitos e leucócitos, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina, atividade respiratória de leucócitos, glicemia, proteínas totais, albumina e também foi estimado o valor de globulinas. O nível de 0,6 mg.kg⁻¹ de selênio promoveu o melhor ganho de peso e TCE. A atividade respiratória de leucócitos, número de leucócitos e trombócitos reduziram após o desafio. A inclusão de 1,2 mg.kg⁻¹ de selênio está relacionada com o aumento de proteínas totais e globulinas, independente da concentração de vitamina E, enquanto a deficiência de selênio resultou no aumento da glicemia. O número de eritrócitos sofreu influência tanto dos níveis de selênio como dos níveis de vitaminas E, as demais variáveis hematológicas foram observadas apenas efeito do selênio. A inclusão de 1,2 mg.kg⁻¹ de selênio e 200 mg.kg⁻¹ de vitamina E na dieta de juvenis de pacu mostrou-se satisfatória para o crescimento e imunidade dos peixes.

Palavras chave: Peixe tropical, micronutrientes, imunoestimulante

PHYSIOLOGY VARIABLES AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN JUVENILES OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*) FED WITH DIFFERENT LEVELS OF SELENIUM AND VITAMIN E.

Abstract – The immunostimulant capacity of selenium and of vitamin E is known. However, little is known about the interaction of these two ingredients on biological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenile. Thus, the purpose of this study was to evaluate the physiological, immunological and productive performance of this fish to the oral administration of three levels of selenium (0, 0.6 and 1.2 mg.kg⁻¹), three levels of vitamin E (0, 200 and 400 mg.kg⁻¹) and the profile of these responses before and after challenge with *Aeromonas hydrophila*. The study formed then a 3x3x2 factorial design, distributed in a randomized design with four replications. In each sample were collected randomly, two fish from each aquarium for biometrics, blood was collected via caudal vein puncture and intraperitoneal injection of *Aeromonas* in fish remaining. With biometric data, we assessed weight gain, specific growth rate (SGR) and condition factor. Blood was used to determine hematocrit, erythrocytes, thrombocytes and leukocytes count, mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin concentration, respiratory activity of leukocytes, blood glucose, total protein, albumin, and globulins concentration was estimated. The level of 0.6 mg.kg⁻¹ of selenium had the best average for weight gain and TBI. Respiratory activity of leukocytes, leukocytes and thrombocytes count decreased after challenge. The inclusion of 1.2 mg.kg⁻¹ of selenium are related to the total protein and globulin increase, independent of the concentration of vitamin E, while selenium deficiency resulted in increased blood glucose. The number of erythrocytes was influenced both the levels of selenium and vitamin E levels, the other hematological variables were observed only effect of selenium. The inclusion of 1.2 mg.kg⁻¹ of selenium and 200 mg.kg⁻¹ of vitamin E in the diet of juvenile pacu was satisfactory for growth and immunity of fish.

Key Words: Tropical fish, micronutrient, immunostimulant

Introdução

A intensificação da piscicultura no Brasil despertou grande interesse de produtores e pesquisadores em muitas espécies de peixes com características zootécnicas importantes. Entre elas está o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) um dos peixes nativos de maior importância no Brasil e um dos mais estudados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, pelo grande interesse para a piscicultura comercial e a pesca esportiva (URBINATI et al., 2010), alguns estudos já foram realizados para explorar respostas imunológicas da espécie (ABREU et al., 2006a, b; BILLER, 2007).

O crescimento da piscicultura intensificou os manejos, durante os quais os peixes enfrentam diversas situações geradoras de estresse, como a captura, transporte, confinamento, mudanças na qualidade da água entre outros. Porém, os agentes estressores em aquicultura são inevitáveis, principalmente em condições de criação intensiva, conseqüentemente ocorre o aparecimento de surtos de doenças (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

O uso de quimioterápicos e antibióticos é muito criticado devido ao impacto negativo no ambiente, pelo acúmulo de resíduos, desenvolvimento de resistência às drogas, imunossupressão, além do impacto negativo sobre os consumidores, com conseqüente diminuição do consumo de peixes (ANDERSON, 1992). Esse fato estimulou, na última década, o uso de imunoestimulantes na prevenção e controle de doenças e estudos para avaliar a eficácia de sua utilização como promotores do mecanismo de defesa não específico, ativando assim, a proteção precoce contra infecções (SAKAI, 1999; SAHOO e MUKHERJEE, 2001; SELVARAJ et al., 2005).

O sistema inato dos peixes pode se apresentar de duas formas: imunidade humoral e imunidade mediada por células (imunidade celular). A imunidade humoral é aquela mediada por substâncias não específicas encontradas em fluidos corpóreos, como muco, soro e ovos de peixes, que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos. Essas substâncias são proteínas e

glicoproteínas, entre elas a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento (SHOEMAKER et al., 2001).

Já a imunidade celular é mediada por diversas células de defesa como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas, que vão atuar na lise e eliminação de patógenos intracelulares nos peixes (SECOMBES, 1996).

MORAES et al. (2003) demonstraram que algumas vitaminas exercem efeitos imuno-estimulantes em peixes. A vitamina E ou tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que protege as lipoproteínas das membranas biológicas contra a oxidação (MONTERO et al., 1999; HUNG et al., 2007; MARTINS et al., 2008) e aumenta a absorção de vitamina A (CONN e STUMPF, 1984), melhorando sua resposta a estímulos agressores.

Já o selênio (Se) apresenta um papel ativo no sistema imunológico e reduz o risco de infecções por vírus. A proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos são estimuladas pelo Se (HUGHES, 2000). É também importante para o crescimento e para assegurar um metabolismo adequado. Além disso, melhora a contagem de espermatozoides e apresenta efeito cardioprotetor (REILLY, 1998).

Segundo WALSH et al. (1993) a deficiência de selênio associada a deficiência de vitamina E é devido ao efeito antioxidante de ambos. O selênio é parte integrante da enzima glutathione peroxidase, uma importante proteção celular contra os danos causados pela oxidação dos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) (ROTRUCK et al., 1973; NRC, 1993, LEUNG, 1998). Segundo Watanabe et al. (1997), o nível de atividade da glutathione peroxidase, no fígado ou no plasma, pode ser indicativo do fornecimento de Se ao organismo.

Estudos indicam que o selênio e a vitamina E atuam em manter as funções normais das respostas imunes. Em bagre do canal, a produção do ânion superóxido é maior em dietas com suplementação de Se e vitamina E, quando comparados com dietas cuja suplementação é de apenas um dos nutrientes (WISE et al., 1993). Por outro lado, existem resultados que indicam que o Se e

vitamina E não possuem efeito sinérgico à resistência a doenças em tilápia do nilo (KIM et al., 2003).

A *A. hydrophila* é uma bactéria gram negativa amplamente distribuída nos ambientes aquáticos (MASSA et al., 2001; GONZALEZ et al., 2002), que pode infectar peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, e também o homem (JANDA e ABBOTT, 1998; VIVAS et al., 2004). A doença causada pela *A. hydrophila* têm grande impacto na aquicultura (AUSTIN e AUSTIN, 1999) e podem ser evitadas com tratamentos profiláticos, como o uso de imunoestimulantes ou por medidas curativas (VIVAS et al., 2004).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do selênio e da vitamina E nas variáveis fisiológicas, imunológicas e no desempenho produtivo de juvenis de pacu.

Material e Métodos

Acondicionamento dos peixes

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal. Para o início do experimento, foram utilizados 432 juvenis de pacu, com peso médio $50,78 \pm 9,08$ g e comprimento total médio de $13,30 \pm 0,93$ cm, distribuídos em 36 aquários com capacidade para 100 L, com sistema aberto de renovação de água.

Delineamento experimental

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial ($3 \times 3 \times 2$), sendo, três níveis de selênio (0; 0,6; 1,2 mg.kg^{-1}), três níveis de vitamina E (0; 200 e 400 mg.kg^{-1}) e dois tempo de coleta (antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*), com quatro repetições por tratamento.

Formulação e confecção das dietas experimentais

O selênio foi incluído na dieta na forma de selênio-levedura (Sel-plex[®], Alltech) com concentração de 1000 ppm e a vitamina E utilizada foi fornecida pela empresa MCassab[®] com 50% de atividade. Foram realizadas as correções desses dois ingredientes, como apresentado na Tabela 1.

As nove dietas utilizadas neste estudo foram formuladas com base na maior inclusão de selênio e vitamina E. Foi acrescentado caulim, um ingrediente inerte, para a substituição dos menores níveis do mineral e da vitamina das demais dietas experimentais, mantendo assim, a mesma proporção nutricional em todas as dietas (Tabela 2).

O premix vitamínico e mineral, isento de selênio e vitamina E, foi preparado e fornecido pela FRI RIBE[®]

Tabela 1. Cálculo para o ajuste de selênio e vitamina E

	Atividade (%)	Fator de correção
Vitamina E Mcassab [®]	50	2
Sel-plex	10	0,1
Correção da vitamina E (mg.kg⁻¹)		Correção do selênio (mg.kg⁻¹)
0 x 2 = 0		0 x 0,1 = 0
200 x 2 = 400		0,6 x 0,1 = 0,06
400 x 2 = 800		1,2 x 0,1 = 0,12

Tabela 2. Formulação e composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Farelo de Soja	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00
Farinha de Vísceras	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00
Quirera de Arroz	9,72	9,72	9,72	9,72	9,72	9,72	9,72	9,72	9,72
Farelo de Trigo	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Farelo de Milho	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70
Óleo de Peixe	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fosfato Bicalcico	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
Premix*	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sel-plex	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12
Vitamina E	0,00	0,04	0,08	0,00	0,04	0,08	0,00	0,04	0,08
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Caulin	0,20	0,16	0,12	0,14	0,10	0,06	0,08	0,04	0,00
Composição centesimal calculada									
Matéria Seca %	88,49	88,49	88,49	88,49	88,49	88,49	88,49	88,49	88,49
Energia digestível kcal.kg-1	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8	3419,8
Proteína bruta %	27,26	27,26	27,26	27,26	27,26	27,26	27,26	27,26	27,26
Proteína digestível %	23,26	23,26	23,26	23,26	23,26	23,26	23,26	23,26	23,26
Fibra bruta %	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67
Extrato etéreo %	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67
Extrato não nitrogenado %	44,97	44,97	44,97	44,97	44,97	44,97	44,97	44,97	44,97
Matéria mineral %	4,15	4,15	4,15	4,15	4,15	4,15	4,15	4,15	4,15
Calcio %	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07
Fósforo %	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84

*Composição do premix (kg): Ácido fólico 33,333 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; biotina 0,1 mg; colina 150,00 mg; cobre 10,00 mg; ferro 100,00 mg; iodo 5,00 mg; manganês 70,00 mg; niacina 100,00 mg; vitamina A 3000,00 UI; vitamina B1 6,00 mg; vitamina B12 20,00 µg; vitamina B2 8,00 mg; vitamina B6 3,00 mg; vitamina C 350,00 mg; vitamina D3 3000,00 UI; vitamina K 6,00 mg; zinco 150,00 mg.

A dietas experimentais foram separadas em recipientes individuais para cada caixa e oferecidas aos peixes duas vezes ao dia (9:00 e 16:00) até a saciedade aparente durante 75 dias e o consumo diário de ração foi computado para cada unidade experimental, através da subtração do peso do recipiente cheio pelo peso do recipiente vazio.

Desafio com *Aeromonas hydrophila*

Após os 75 dias de alimentação, dez peixes de cada caixa foram submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila* através de injeção intraperitoneal de 1 mL de solução contendo 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC), quantidade referente a dose letal para 50 % (DL_{50}) dos peixes. Esta concentração foi padronizada pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP para juvenis de pacu.

Antes da realização do experimento, o projeto proposto (protocolo nº 004356/10) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP/Jaboticabal.

Amostragens

Foram realizadas durante todo o experimento três coletas. Uma inicial, para o monitoramento das condições basais dos peixes, uma após 75 dias de alimentação com as dietas experimentais e a última coleta foi realizada duas semanas após o desafio com a bactéria.

Para a realização das coletas, dois peixes de cada caixa foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Após a observação do efeito do anestésico (WOODY et al., 2002), foi realizada a biometria para a mensuração do peso e comprimento total e também, foi realizada a coleta de sangue através de punção do vaso caudal para posteriores análises.

Processamento do sangue

O sangue de cada peixe foi coletado e dividido em três microtubos, o primeiro contendo 15 μL heparina, o segundo 15 μL da solução EDTA + fluoreto de potássio (Glistab[®]) e o último sem anticoagulante. O sangue heparinizado foi utilizado para avaliar a atividade respiratória de leucócitos e para a determinação do hematócrito, número de eritrócitos (NE), volume corpuscular médio dos

eritrócitos (VCM) e concentração de hemoglobina (Contador de Células Celm CC550).

Uma pequena fração do sangue total foi utilizada para estimar o número total de células brancas e trombócitos por esfregaço sanguíneo em lâmina de microscopia. Este método consiste em quantificar o número de leucócitos, eritrócitos e trombócitos existentes em 2000 células sanguíneas.

O sangue contendo Glistab[®] foi centrifugado a 3000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e posterior análise de glicemia pelo kit comercial de Glicose PAP (Labtest[®]). O sangue sem anticoagulante foi mantido em temperatura ambiente durante três horas para posterior centrifugação a 3000 RPM durante 10 minutos. O soro foi separado para análise de proteínas totais e albumina (Labtest[®]).

Análises realizadas

Concentração de globulinas

A concentração de globulinas foi estimada através da diferença entre a concentração de proteínas totais e concentração de albumina.

$$\text{Globulinas (g.dL}^{-1}\text{)} = \text{Proteínas Totais (g.dL}^{-1}\text{)} - \text{Albumina (g.dL}^{-1}\text{)}$$

Atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de ANDERSON e SIWICKI (1995). O método consistiu na determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de *nitroblue tetrazolium* (NBT, Sigma, St

Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25 °C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N - dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005).

Desempenho produtivo

Para avaliar o desempenho produtivo dos peixes, foram calculados o ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição (K), através das seguintes equações:

$$GP = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

$$TCE = \frac{\ln \text{Peso final} - \ln \text{peso inicial}}{\text{tempo}} \times 100$$

Onde,

Ln Peso final = logaritmo neperiano do peso final

Ln Peso inicial = logaritmo neperiano do peso inicial

$$K = \frac{\text{Peso}}{\text{comprimento}^3}$$

Monitoramento da qualidade de água

Três vezes por semana foram monitorados a temperatura ($27,03 \pm 0,42$ °C) e o oxigênio dissolvido ($4,03 \pm 0,89$ mg.L⁻¹) de todas as caixas (Oxímetro YSI 55) e

semanalmente foram observados os valores de pH ($7,57 \pm 0,09$) e amônia total ($0,39 \pm 0,26 \text{ mg.kg}^{-1}$) através do método colorimétrico de Nessler. Os parâmetros de qualidade de água estiveram dentro do intervalo considerado ideal para a espécie (URBINATI et al., 2010).

Análise estatística

Para as variáveis de desempenho produtivo, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando observada diferença estatística a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste Tukey. Para as demais variáveis, os resultados foram submetidos à ANOVA, quando observada diferença estatística a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste Tukey e na ocorrência de interações, foi utilizado o teste de comparação múltipla Tukey-Kramer através do programa estatístico SAS (V8.0). Os resultados deste estudo estão apresentados na forma gráfica com médias e desvios-padrão. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferenças significativas.

Resultados e Discussão

Durante o período de alimentação, não ocorreu mortalidade e diferença significativa no consumo de ração. Após a injeção intraperitoneal de *Aeromonas*, observou-se baixo consumo de alimento e alguma mortalidade aleatória e o aparecimento de sinais clínicos, evidenciando a eficácia da inoculação.

Desempenho produtivo

As estatísticas obtidas através da análise de variância dos dados de desempenho produtivo: ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição (K) estão apresentadas na Tabela 3. Observou-se participação da suplementação de selênio no GP e TCE e efeito de interação de selênio e vitamina E apenas para TCE.

Tabela 3. Análise de variância das variáveis de desempenho produtivo GP, TCE e K de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Estatística	Variáveis de Desempenho		
	GP	TCE	K
F para Se	3,6*	4,37*	0,16 ^{ns}
F para Vit E	1,52 ^{ns}	2,17 ^{ns}	0,79 ^{ns}
F para Se x Vit E	1,08 ^{ns}	3,51*	1,3 ^{ns}
CV (%)	49,63	39,71	39,71

Legenda: * indica diferença significativa para os fatores testados ($p < 0,05$)

ns: não significativo

A Figura 1 mostra a participação do selênio como única fonte de variação dos dados de ganho de peso. As dietas que continham concentração de $1,2 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ resultaram nos menores valores de ganho de peso. Esta redução pode ser relacionada com a toxicidade primária causada pelo selênio, neste caso é possível observar falhas no processo de síntese protéica, devido à substituição do enxofre pelo selênio, no caso dos aminoácidos sulfurados (LEMLY, 2002), resultando em enzimas e moléculas protéicas distorcidas e disfuncionais. A contaminação dos ecossistemas aquáticos por Se causa efeitos tóxicos em peixes, ocasionando crescimento reduzido e mortalidade (GATLIN III e WILSON, 1984).

Resultados semelhantes foram encontrados para juvenis de garoupa alimentados com diferentes níveis de selênio, LIN e SHIAU (2005) observaram redução significativa no ganho de peso com o fornecimento de dietas contendo níveis de selênio superiores a 2 mg Se.kg^{-1} . Já, segundo LIN e SHIAU (2009), em estudo avaliando a interação do selênio e da vitamina E em juvenis de garoupa, observaram que a necessidade vitamina E ideal para o crescimento está intimamente relacionada com o nível de selênio na dieta. Os resultados

apresentados na Tabela 4 mostram que o crescimento não foi afetado pelos níveis de selênio, quando associados a 200 mg.kg^{-1} de vitamina E.

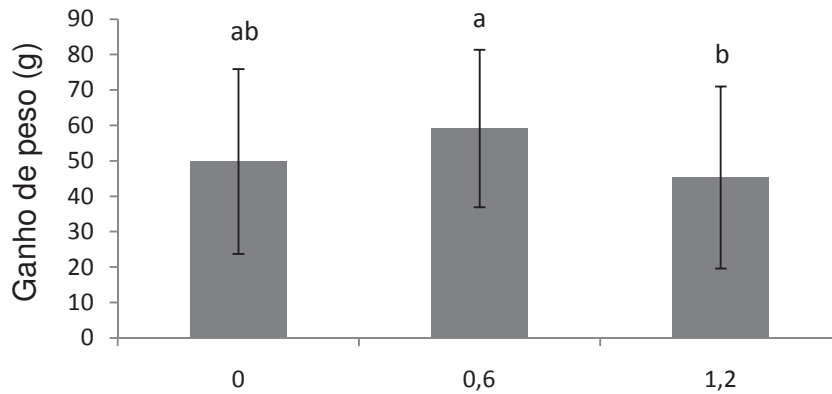


Figura 1. Médias \pm desvio padrão do ganho de peso (g) de pacu alimentados com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferença entre os níveis ($P < 0,05$).

Para a taxa de crescimento específico, assim como no ganho de peso, ocorreu o efeito do selênio como fonte de variação, porém, também foi possível observar o efeito da interação do selênio e da vitamina E na variação dos dados (Figura 2.). A Tabela 5 mostra o desdobramento desta interação, onde é possível observar que dentro nos níveis e 400 mg.kg^{-1} de vitamina E associados ao maior nível de selênio ($1,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) resultaram nas menores médias a 5% de probabilidade.

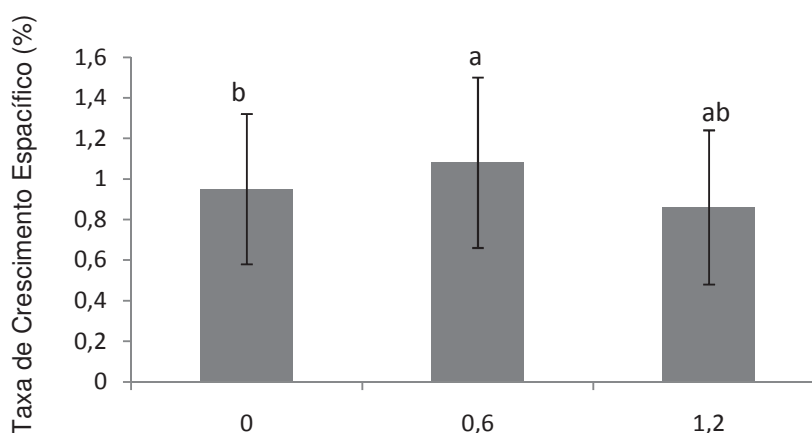


Figura 2. Médias \pm desvio padrão de taxa de crescimento específico (g) de pacu alimentado com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferença entre os níveis ($P < 0,05$).

Tabela 4. Comparação das médias da taxa de crescimento específico (%) (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Vitamina E (mg.kg ⁻¹)	Selênio (mg.kg ⁻¹)		
	0	0,6	1,2
0	0,95 \pm 0,4abA	1,18 \pm 0,4aA	0,68 \pm 0,3 bB
200	0,89 \pm 0,3aA	0,82 \pm 0,4 aB	0,99 \pm 0,4 aA
400	1,00 \pm 0,3 abA	1,26 \pm 0,3 aA	0,90 \pm 0,3 bAB

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

O Fator de condição não diferiu em nenhuma das fontes de variação. Esta variável é um importante indicador do grau de hígidez de um indivíduo e seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, evidenciando interações entre fatores bióticos e abióticos sobre as condições fisiológicas dos peixes (VAZZOLER, 1996; LIZAMA e AMBRÓSIO, 2002).

Variáveis fisiológicas e imunológicas

A Tabela 5 apresenta as estatísticas obtidas na análise de variância das variáveis fisiológicas e imunológicas: atividade respiratória de leucócitos (Burst), número total de leucócitos (WBC), proteínas totais, albumina, globulina e glicemia de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Tabela 5. Análise de variância das variáveis fisiológicas e imunológicas de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Estatística	Variáveis fisiológicas e imunológicas					
	Burst	WBC	Prot totais	Albumina	Globulina	Glicemia
F para Tempo	58,48**	9,7*	204,09**	3,12 ^{ns}	89,29**	40,33**
F para Se	0,91 ^{ns}	0,49 ^{ns}	1,37 ^{ns}	1,51 ^{ns}	4,74*	5,16*
F para Vit E	0,48 ^{ns}	1,18 ^{ns}	0,23 ^{ns}	1,62 ^{ns}	1,99 ^{ns}	1,07 ^{ns}
F para Se x Vit E	2,06 ^{ns}	0,54 ^{ns}	3,05*	1,37 ^{ns}	0,77 ^{ns}	1,58 ^{ns}
F para Se x Vit E x Tempo	2,2 ^{ns}	0,55 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,62 ^{ns}	1,19 ^{ns}	01,37 ^{ns}
F para Se x Tempo	1,77 ^{ns}	1,41 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,77 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,97 ^{ns}
F para Vit E x Tempo	1,5 ^{ns}	0,96 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,67 ^{ns}	2,69 ^{ns}
CV (%)	14,32	37,01	9,22	14,25	19,21	39,67

Legenda: * indica diferença significativa para os fatores testados ($p < 0,05$)

** indica diferença significativa para os fatores testados ($p < 0,01$)

ns: não significativo

Número de leucócitos totais e atividade respiratória de leucócitos – Burst oxidativo

Não foi possível observar efeito dos níveis de selênio e/ou vitamina E para o número total de leucócitos e atividade respiratória de leucócitos. Após o desafio com a bactéria houve a redução na produção de EROS pelos leucócitos. Esta

diminuição aparente na atividade está relacionada com a redução do número de leucócitos (Tabela 6).

Outros trabalhos, com truta arco-íris (LAMAS et al., 1994) e com pacu (GARCIA e MORAES, 2009), também observaram a redução do número de leucócitos após o desafio com bactéria. Esta redução pode ser explicada pela migração dos leucócitos para o foco da inflamação (LAMAS et al., 1994). Em pacu, a hipótese de migração celular foi relatada por BOZZO et al. (2007). Outra hipótese provável a redução do número de leucócitos é que esta variável está intimamente relacionada com condições de estresse, sendo que a alta densidade de estocagem, manipulação dos peixes, e injeção com bactéria, podem ter causado supressão das funções imunes dos peixes, resultando na redução do número de leucócitos (WEENDELAR-BONGA, 1997).

Por outro lado, WISE et al. (1993), avaliando a produção intra e extracelular de superóxido nos macrófagos dos rins do bagre do canal alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E, observaram efeito de ambos microminerais na produção intracelular de íons superóxido. Já nas condições em que este estudo foi realizado, não foi possível observar alterações na produção de EROS.

Tabela 6. Comparação das médias da atividade respiratória de leucócitos (Burst) e leucócitos totais de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Variáveis	Tempo	
	Antes	Após
Burst	0,179 ± 0,02 a	0,147 ± 0,02 b
Leucócitos	0,59 ± 0,15 a	0,41 ± 0,15 b

Letras minúsculas na linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Proteínas totais, albumina e globulinas

Os resultados mostraram que houve o aumento da concentração de proteínas totais no sangue de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E após o desafio com a bactéria. A Tabela 7 apresenta a participação de cada nível de selênio juntamente com cada nível de vitamina E, e foi possível observar que independente do nível de vitamina E, a concentração de proteínas totais no sangue tende a aumentar a medida que aumenta a inclusão de selênio na dieta de pacu.

De acordo com LIN e SHIAU (2009), altas concentrações de selênio na dieta possuem efeito poupador da necessidade de vitamina E. Os resultados obtidos neste trabalho indicam o mesmo efeito ao observar que para as dietas com $1,2 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ não foi possível observar diferenças significativas na concentração de proteínas totais nos diferentes níveis de vitamina E .

O aumento na concentração de proteínas totais ocorreu em função do aumento da concentração de globulinas, uma vez que a quantidade de albumina manteve-se inalterada (Figura 3) durante todo o período experimental. O grupo de proteína referente às globulinas está relacionado, na maioria das situações com processos inflamatórios e concentração de anticorpos (KANEKO, 1997). Os resultados deste estudo sugerem que houve desvio de proteína dietética para a produção de proteínas envolvidas com mecanismos de defesa dos peixes. É possível observar também que a inclusão de $1,2 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ proporcionou maior concentração de globulinas no soro de pacus.

Os dados obtidos neste trabalho contradizem os resultados já relatados na literatura (KANEKO, 1989; BOON et al., 1990; GARCIA e MORAES, 2009). Todos relataram que os níveis de proteínas totais e globulinas do sangue reduzem após o desafio com bactéria ou parasitas, para que ocorra a reposição de tecidos danificados e lesados no processo inflamatório (KENEKO, 1989). Este estudo sugere que nas condições onde o experimento foi realizado, a suplementação de selênio e vitamina E na dieta de pacus minimizam os danos causados pela infecção por *Aeromonas*, uma vez que em condições de deficiência de selênio e

vitamina E a concentração de proteínas totais estiveram próximas dos valores obtidos antes do desafio.

Tabela 7. Comparação das médias de proteínas totais (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Selênio	Vitamina E		
	0	200	400
0	3,07 ± 0,48 Bb	3,28 ± 0,29 Aab	3,38 ± 0,28 Aa
0,6	3,36 ± 0,46 ABa	3,17 ± 0,43 Aab	3,13 ± 0,41 Bb
1,2	3,41 ± 0,53 Aa	3,27 ± 0,42 Aa	3,35 ± 0,48 Aa

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

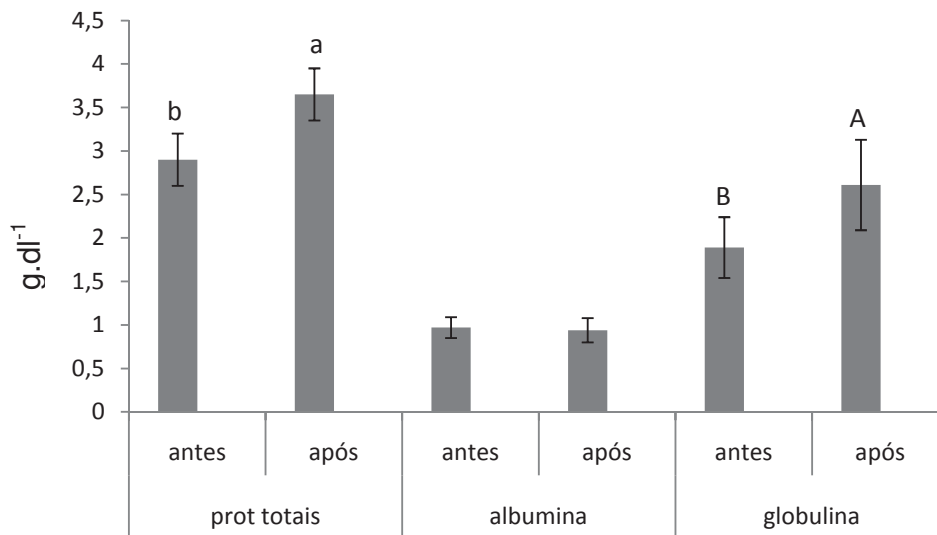


Figura 3. Média e desvio padrão de proteínas totais, albumina e globulina antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Glicemia

Em teleósteos, a concentração de glicose plasmática varia de acordo com a idade, sexo, fatores genéticos, alterações ambientais, condição nutricional na qual os peixes são submetidos (RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1988) e estresse.

Neste estudo, foi observada a redução da glicemia após o desafio bacteriano. Este fato pode ser explicado devido à ausência ou pouca ingestão de alimento, sinal clínico observado em situação de aeromonose (PLUMB, 1994). Por outro lado, houve a participação do selênio na variação glicêmica, onde o aumento da glicemia foi evidente a medida que a concentração de selênio na dieta de pacu foi reduzida. Este dado sugere que houve mobilização de energia para compensar a deficiência de selênio, o que pode indicar uma situação de estresse metabólico.

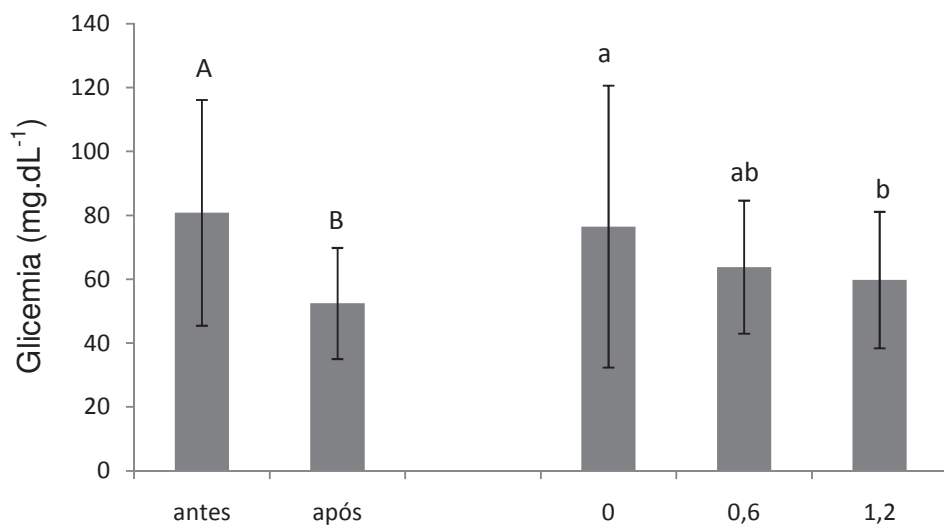


Figura 4. Médias e desvio padrão de glicemia de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Variáveis hematológicas

As estatísticas obtidas através da análise de variância para número de eritrócitos (RBC), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM) e número de trombócitos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Análise de variância das variáveis de hematológicas de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Estatística	Variáveis Hematológicas				
	RBC	HCT	VCM	HGB	Tromb
F para Tempo	0,79 ^{ns}	51,84 ^{**}	25,13 [*]	0,01 ^{ns}	26,07 [*]
F para Se	6,29 [*]	6,52 [*]	5,29 [*]	5,52 [*]	2,11 ^{ns}
F para Vit E	3,34 [*]	2,47 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,38 ^{ns}	1,57 ^{ns}
F para Se x Vit E	2,74 [*]	0,44 [*]	0,13 ^{ns}	2,27 ^{ns}	1,24 ^{ns}
F para Se x Vit E x Tempo	0,71 ^{ns}	1,49 ^{ns}	0,98 ^{ns}	1,21 ^{ns}	0,32 ^{ns}
F para Se x Tempo	0,56 ^{ns}	3,07 ^{ns}	1,65 ^{ns}	0,05 ^{ns}	1,06 ^{ns}
F para Vit E x Tempo	1,6 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,55 ^{ns}	3,44 [*]	0,85 ^{ns}
CV (%)	14,89	16,33	3,44	16,9	33,71

Legenda: * indica diferença significativa para os fatores testados ($p < 0,05$)

** indica diferença significativa para os fatores testados ($p < 0,01$)

ns: não significativo

Eritrócitos totais

Neste trabalho foi possível observar a redução de forma linear na contagem de eritrócitos ao aumentar a quantidade de selênio fornecida. Resultado semelhante foi encontrado por ORUM, et al. (2005) com truta arco-íris alimentados com diferentes concentrações de selênio inorgânico

Por outro lado, segundo GARCIA et al. (2007) com pacu e LIM et al. (2010) com tilápia do nilo não observaram alteração no número de eritrócitos com a inclusão de Vitamina E na dieta. Já neste estudo, observa-se a redução na contagem de eritrócitos nos peixes que ingeriram dietas contendo 400 mg vitamina E.kg⁻¹.

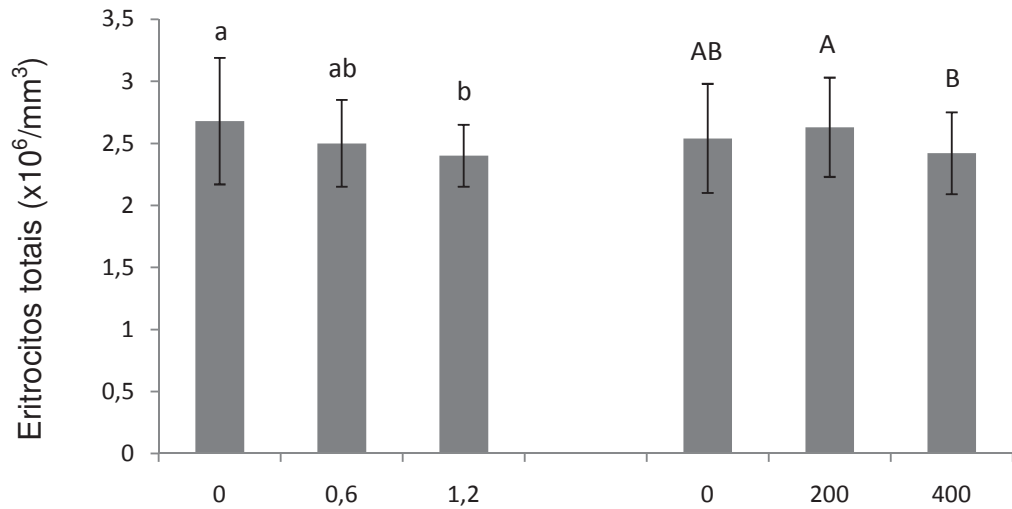


Figura 5. Médias e desvio padrão de eritrócitos totais de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Tabela 9. Comparação das médias de eritrócitos totais (desdobramento da interação selênio x vitamina E) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Selênio (mg.kg ⁻¹)	Vitamina E (mg.kg ⁻¹)		
	0	200	400
0	2,83 ± 0,67 A	2,69 ± 0,50 AB	2,53 ± 0,29
0,6	2,40 ± 0,16 Bb	2,80 ± 0,31 Aa	2,36 ± 0,36 b
1,2	2,41 ± 0,21 B	2,40 ± 0,20 B	2,39 ± 0,32

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Hematócrito

Dentre os fatores de variação testados, apenas o tempo de coleta e nível de selênio diferiram significativamente ($P < 0,05$) (Figura 6). Entretanto, GARCIA et al. (2007) em estudo, com a mesma espécie, observou que o hematócrito tende a diminuir a medida que aumenta a inclusão de vitamina E.

No presente estudo foi observada a redução do hematócrito com o aumento da concentração de selênio na dieta. Semelhante ao encontrado em sunfish (SORENSEN e BAUER, 1984) e tilápia do nilo (GONÇALVES, 2004).

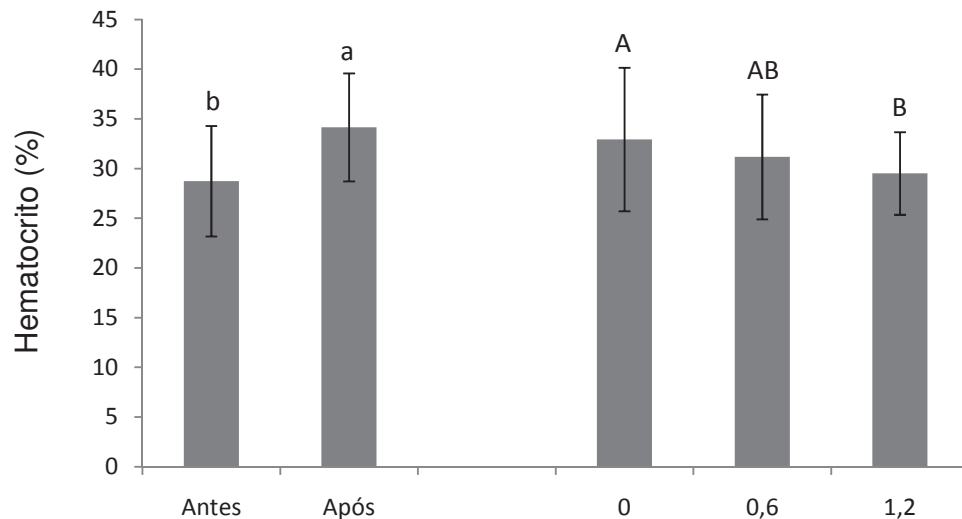


Figura 6. Médias e desvio padrão de hematócrito de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Volume corpuscular médio (VCM)

O VCM sofreu efeito do período de amostragem e dos níveis de selênio na dieta (Figura 7), como encontrado também em tilápia do nilo expostas a concentrações sub-letais de selenito de sódio, que apresentaram diminuição do volume corpuscular médio conforme o aumento da concentração de Se na água (GONCALVES, 2004). Entretanto, a influência do selênio dietético ainda não é bem definido, GOMES (2008) com tilápia do nilo e HILTON e HODSON (1983) utilizando truta arco-íris não observaram alteração VCM com diferentes níveis de suplementação de selênio

Resultados encontrados por BILLER (2008) e SABIONI (2009), utilizando β -glucano em dietas de pacu e vitamina E, respectivamente, não encontraram variação do volume dos eritrócitos após o desafio com bactéria. Já neste estudo, foi observado aumento significativo do VCM após a injeção intraperitoneal de *Aeromonas*, indicando hemodiluição, indicador típico de situação de estresse, em que há o aumento da permeabilidade das lamelas branquiais e conseqüente perda de íons para o meio externo (URBINATI e CARNEIRO, 2004). A hemodiluição por sua vez está relacionada com a redução da biossíntese de hemoglobina, prejudicando o transporte de O_2 (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

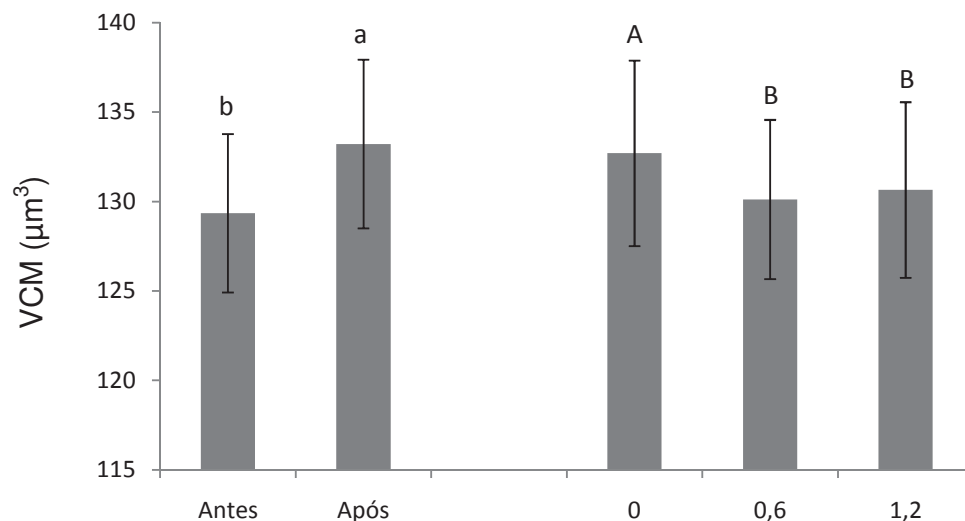


Figura 7. Médias e desvio padrão de volume corpuscular médio de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Hemoglobina

A concentração de hemoglobina sofreu efeito dos níveis de selênio (Figura 8). Assim como já relatado em diversos trabalhos (SORENSEN e BAUER, 1984; PETERS et al., 1999; MORA et al., 2001; GONÇALVES, 2004), a concentração de hemoglobina reduziu com o aumento da inclusão de selênio. Na interação de dos

níveis de vitamina E com o tempo de amostragem, foi possível observar que altas concentrações de vitamina E resultaram em sinais clínicos de anemia nos peixes devido as lesões hemorrágicas causadas pela bactéria (JAIN, 1986). A relação entre anemia e infecção por patógeno já foi observado por TAVARES-DIAS et al. (2002).

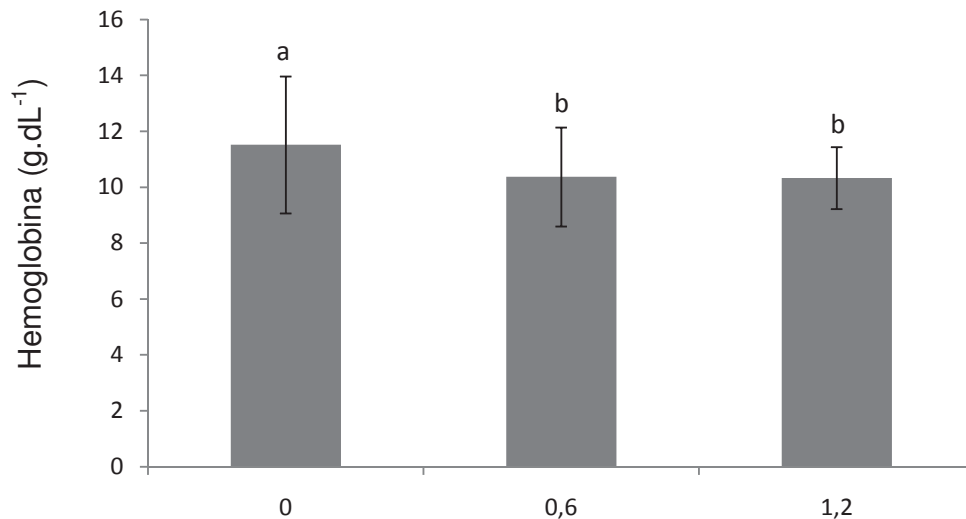


Figura 8. Médias e desvio padrão de hemoglobina de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Tabela 10. Comparação das médias de concentração de hemoglobina (desdobramento da interação vitamina E x tempo) de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E.

Tempo	Vitamina E		
	0	200	400
Antes	10,21 ± 1,65	11,19 ± 2,05	11,31 ± 1,92 a
Após	11,01 ± 1,98	10,94 ± 1,16	9,91 ± 2,40 b

Letras minúsculas na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Trombócitos

Não foi observado efeito de tratamento e interações na variação do número de trombócitos, apenas efeito do desafio (Figura 9). A redução do número de trombócitos observado neste estudo também foi encontrado por LAMAS et al.

(1994) e GARCIA e MORAES (2009). A redução do número de leucócitos e trombócitos sanguíneos pode estar relacionada à migração dessas células para o foco de inflamação, assim como verificado por LAMAS et al. (1994). Segundo Secombes (1996), durante as respostas inflamatórias, primeiro ocorre o aumento no suprimento de sangue da área infectada, acompanhado por aumento na permeabilidade capilar e depois migração dos leucócitos e trombócitos para fora dos capilares circundando o tecido infectado. O patógeno, então, é rapidamente rodeado por uma rede de células fagocíticas com potente atividade microbicida, que impede sua expansão ou o remove completamente.

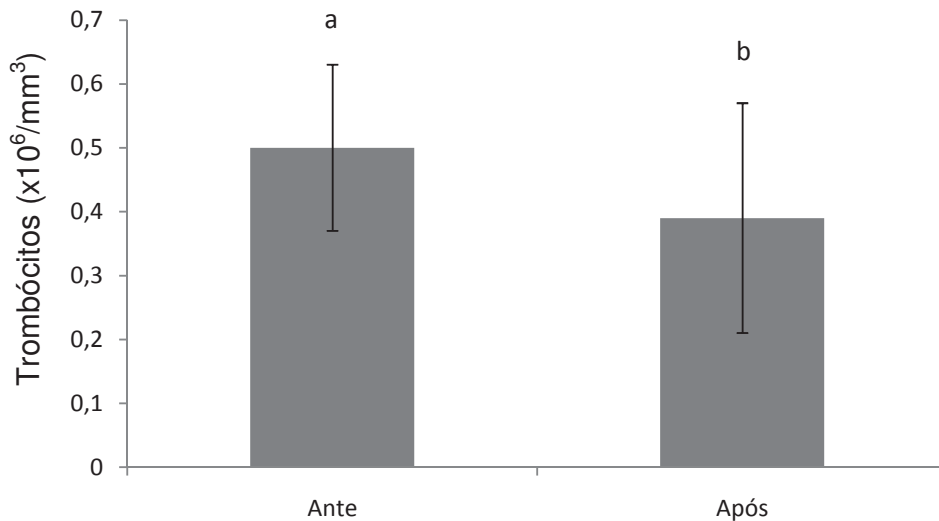


Figura 9. Médias e desvio padrão de número de trombócitos de pacus alimentados com diferentes níveis de selênio e vitamina E, antes e após o desafio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Conclusões

Os resultados obtidos nas condições que o experimento foi realizado indicam que selênio possui maior influência no ganho de peso de juvenis de pacu do que a suplementação de vitamina E, sendo que $0,6 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ promoveu melhores resultados para as variáveis de desempenho produtivo. Já as variáveis hematológicas indicam que $200 \text{ mg de vitamina E.kg}^{-1}$ promoveu melhores

condições de sanidade. Neste trabalho foi possível observar que a suplementação de selênio e vitamina E em dietas de pacu mostrou-se satisfatória nas respostas imunológicas de juvenis de pacu.

Referências Bibliográficas

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Efeito do beta 1,3 glicano, administrado intraperitonealmente e pela dieta, no perfil hematológico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA 2006, **Anais**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006a.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Prevenção do estresse de captura em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA 2006, **Anais**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.281-307, 1992.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, **Asian Fisheries Society**, p.185-202. 1995.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3rd Edition. 1999. 459p. ISBN 1852331208.

BILLER, J.D. **RESPOSTAS FISIO-PATOLÓGICAS E DESAFIO POR *Aeromonas hydrophila* EM PACU ALIMENTADO COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM 1,3**

β-GLUCANO. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 59p, 2008.

BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A. M.; CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of Cellular Component in Inflammatory Response Induced by Different Stimuli in the Swim Bladder of Pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

CONN, E.E., STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. 4 ed. Sao Paulo: Edgard Blucker LTDA,. 531p, 1984.

GARCIA, F., MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*, **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009

GARCIA, F., PILARSKI, F., ONAKA, E.M., MORAES, F.R., MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, p. 39-46, 2007.

GATLIN III, D.M.; WILSON, R.P. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. **Journal of Nutrition**, v.114, p.627-633, 1984.

GOMES, G.R. **Suplementação com selênio orgânico nas dietas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008

GONÇALVES, A. **Concentração Letal CL50-96h e efeitos sub-letais do selenito de sódio (Na₂SeO₃) em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757): alterações hematológicas e histopatológicas..** Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. p.70, 2004.

GONZALEZ, C.J.; SANTOS, J.A.; LOPEZ, M.L.G.; OTERO, A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii biovar sorbia* isolates from fresh water fish and from a diarrhoea case. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.414-419, 2002.

HUGHES, D. A. Dietary antioxidants and human immune function, **Nutrition Bulletin**, v. 25, p. 35-41, 2000.

HUNG, S., TU, C., WANG, W. In vitro effects of singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1-15, 2007.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.332-344, 1998.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932p.

KIM, K. W.; WANG, X.; CHOI, S. M.; PARK, G. J.; KOO, J. W.; BAI, S. C. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 12, p. 1055-1058, 2003.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc., p.311-334, 1990.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 5, p. 839-854, 1994

LEMLY, A.D. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews lake case example. **Aquatic Toxicology**, v.57, p.39-49, 2002.

LEUNG, F.Y. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.9, p.304-307, 1998.

LIM, C., YILDRIM-AKSOY, M. WELKER, T., KLESIUS, P.H. Growth Performance, Immune Response, and Resistance to *Streptococcus iniae* of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fed Diets Containing Various Levels of Vitamins C and E. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 41, n. 1. p. 35-48, 2010

LIN, Y.H., SHIAU, S.Y. Dietary selenium requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture** v. 250, p. 356–363, 2005.

LIN, Y.H., SHIAU, S.Y. Mutual sparing of dietary requirements for alpha tocopherol and selenium in grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**. v. 294. p. 242-245, 2009.

LIZAMA, M.A.P.; AMBRÓSIO, A.M. Condition factor in nine species of fish of the Characidae family in the upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biol.**, São Carlos, v. 62, n. 1, p. 113-124, 2002.

MARTINS, M. L., MIYAZAKY, D. M. Y., MORAES, F. R., GHIRALDELI, L., ADAMANTE, W. B., MOURINO, J.L.P. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciencia Rural**, v. 38, p. 213-218,2008.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas spp.* in natural mineral water and well water. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.169-173, 2001.

MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, v.171, p. 269-278, 1999.

MORA, M.A.; PAPOULIAS, D.; NAVA, I.; BUCKLER, D.R. A comparative assessment of contaminants in fish from four resacas of the Texas, USA-Tamaulipas, Mexico border region. **Enviroment International**, v.27, p.15-20, 2001.

MORAES, J.R.E., FREITAS, J. B., BOZZO, F.R., MORAES, F.R. E MARTINS, M. L. A Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 57-67, 2003.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of fish. Washington: **National Academy Press**, 114p, 1993.

ORUN, I., ATEŞ, B., SELAMOĞLU, Z., YAZLAK, H., ÖZTÜRK, E., YILMAZ, I. Effects of various sodium selenite concentrations on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fresenius Environmental Bulletin**. v. 14, n. 1, p. 18-22. 2005.

PETERS, G.M.; MAHER, W.A.; KRIKOWA, F.; ROACH, A.C.; JESWANI, H.K.; BARFORD, J.P.; GOMES, V.G.; REIBLE, D.D. Selenium in sediments, pore waters and benthic infauna of Lake Macquarie, New south Wales, Australia. **Marine Environmental Research**, v.47, p.491-508, 1999.

PLUMB, J.A. **Health maintenance of cultured fishes**. Principal microbial diseases. USA : CRC, 254p, 1994.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. IBAMA, Brasília, 1994. 195p.

Ranzani-Paiva, MJ.T.; Godinho, H.M. Características do plasma sangüíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições experimentais de criação. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.2, p.169-177, 1988.

REILLY, C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, p. 114-118, 1998.

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p.588-590, 1973.

SABIONI, R.E. **SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) COM VITAMINA C: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, IMUNIDADE NÃO ESPECÍFICA E RESISTÊNCIA À INOCULAÇÃO COM *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 59p, 2009.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary α -1-3-glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1 induced

immunocompromised rohu (*L. rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.683-695, 2001.

Sahoo, P. K.; Kumari, J.; Mishra, B. K Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal Applied Ichthyology**. v. 21, p. 151–155, 2005.

SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p.63- 92, 1999.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). The fish immune system. London: **Academic Press**. p.95-103, 1996

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.293-306, 2005.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and fish health**. New York: Food Products Press, 2001. p.149-162.

SORENSEN, E.M.B.; BAUER, T.L. A correlation between selenium accumulation in sunfish and changes in condition factor and organ weight. **Environmental Pollutant**, v.34, p.357-366, 1984.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144p., 2004.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.;

CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p.171-194.

URBINATI, E.C., GONCALVES, F.D., TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) In: BALSISSEOTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Segunda edição. Santa Maria: Editora UFSM, v. único, p. 205-244, 2010.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Eduem, 1996.

VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIANO, J.; RAZQUIN, B.E.; LOPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A.J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70,p.2702-2708, 2004.

WALSH, D. M., KENNEDY, D. G., GOODALL, E. A. & KENNEDY, S. Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both. **Brazilian Journal of Nutrition**. v. 70, p. 621–630, 1993.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185-207, 1997.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. **Physiological Reviews**, Boston, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WISE, D. J., TOMASSO, J. R., SCHEWEDLER, T. E., GATLIN, D. M., BAI, S. C., BLAZER, V. S. Effect of vitamin E on the immune response of channel catfish to *Edwardissiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 5, p. 183-188, 1993.

WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.340-347, 2002.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O selênio e a vitamina E possuem atividades bioquímicas diferentes, porém suas funções se complementam. Este estudo mostrou a importância da interação de vitamínica e mineral com o aumento das respostas imunológicas. Vale ressaltar a importância desses dois compostos em manter as funções bioquímicas e fisiológicas em níveis normais e a importância destes, no combate aos danos causados pelo estresse oxidativo.